

葡萄灰霉病菌 Flipper 转座子扩增体系的建立和优化

常佳迎¹ 寇宏达² 乔丹娜¹ 张艳杰¹ 赤国彤¹ 李亚宁¹ 李兴红³ 刘大群¹

(1. 河北农业大学 植物保护学院 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学 国际合作处 河北 保定 071001; 3. 北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所 北京 100097)

摘要: 通过对模板 DNA、Primer、dNTPs、10 × Taq 10 Buffer、Taq 酶的不同浓度进行单因素筛选, 并对退火温度和循环次数进行摸索, 建立和优化了灰葡萄孢菌 Flipper 转座子 PCR 扩增体系。采用该体系及 Flipper 转座子引物扩增得到了 1 159 bp 的片段, 通过比对发现, 该片段与 *Botryotinia fuckeliana* 的 Flipper 转座因子转座酶基因相似性达 99%, 表明扩增得到的是预期目的片段。Flipper 转座子扩增体系的建立, 为深入研究我国葡萄灰霉病菌菌株的转座子类型及其与致病力、抗药性等因素之间的关系奠定了重要的基础。

关键词: 灰葡萄孢菌; Flipper 转座子; PCR 扩增体系; 单因素筛选

中图分类号: Q78; S436.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0227-07

Establishment and Optimization of Flipper Transposon PCR Amplification System of the Grape *Botrytis cinerea*

CHANG Jia-ying¹ KOU Hong-da² QIAO Dan-na¹ ZHANG Yan-jie¹ CHI Guo-tong¹,
LI Ya-ning¹ LI Xing-hong³ LIU Da-qun¹

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071001, China; 2. Department of International Cooperation, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 3. Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: Grape gray mold caused by *Botrytis cinerea* Pers. is one of the most important diseases on grapes worldwide. The genetic variation of *Botrytis cinerea* is widely and adaptable, which is easy to produce drug-resistant strains. It is reported that Boty and Flipper transposon of *Botrytis cinerea* are related to the presence or absence of resistant strains. By setting different gradient and optimize *Botrytis cinerea* Flipper transposon PCR amplification system of grape in China, including template DNA, primer, dNTPs, 10 × Taq 10 Buffer, Taq DNA polymerase, annealing temperature, cycle index, the 1 159 bp fragment was obtained, which has 99% similarity with *Botryotinia fuckeliana* Flipper transposable element transposase gene through NCBI blastn. So the amplified fragment is verified as expected target fragment. The establishment and optimization of Flipper transposon PCR amplification system of the grape *Botrytis cinerea* in China provide an important foundation to further study of the relationship between the transposable elements, pathogenicity and resistant.

Key words: *Botrytis cinerea*; Flipper transposable elements; PCR amplification system; Single factor screening

由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)引起的葡萄灰霉病是世界葡萄生产上的重要病害。灰葡萄孢菌属半知菌亚门灰葡萄孢属,其腐生性强,在自然界分布广泛,能够侵染茄科(番茄、辣椒等)、葫芦科

(黄瓜、西葫芦等)、蔷薇科(草莓、海棠等)、葡萄科等 400 余种植物的各个部位,引起灰霉病^[1]。该病原菌菌源复杂,遗传变异大、适应能力强,属于高风险病菌,很容易产生抗药性菌株^[2]。Boty 和 Flipper

收稿日期: 2013-03-17

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-30); 河北省自然科学基金项目(C2011204114)

作者简介: 常佳迎(1989-),女,河北赵县人,在读本科,主要从事植物病害生物防治研究。

通讯作者: 李亚宁(1974-),女,河北石家庄人,教授,博士,博士生导师,主要从事植物病害生物防治研究。

李兴红(1962-),女,河北乐亭人,研究员,硕士,主要从事植物病理学研究。

是在葡萄灰霉病菌中发现的 2 个转座子。1997 年, Giraud 等^[3] 根据灰葡萄孢菌株基因组中是否存在 Boty 和 Flipper 转座子, 将其分为 2 个群组: *vacuma* (不包含 Boty 和 Flipper 转座子) 和 *transposa* (包含 Boty 和 Flipper 转座子), 这 2 个群组在寄主范围、遗传多样性及生长势方面表现出差异, 并且在分生孢子的大小、生长率、对乙烯菌核利和乙霉威杀菌剂抗性方面也表现出差异性。

在我国, 对灰葡萄孢菌的研究大多集中在其生物学特性、致病力检测和抗药性鉴定等方面。雷百战等^[4] 研究了采自新疆不同地区的多个葡萄灰霉病菌菌株的生物学特性, 检测了灰葡萄孢霉对红地球葡萄的致病性。李喜玲^[5] 以番茄、辣椒、草莓、葡萄等不同寄主来源的灰葡萄孢为供试菌株, 测定了不同寄主来源的灰葡萄孢对不同寄主的致病性。张夏兰等^[6] 对目前生产上常用的 6 种农药进行了室内和田间葡萄灰霉病防治效果试验, 发现速克灵、施佳乐、多抗霉素和百泰效果最好, 宁南霉素次之, 武夷菌素的效果相对较差。

目前, 对我国葡萄灰霉病菌分子水平的研究较少。余文贵等^[7] 利用 SSR 分子标记对 29 个灰霉菌株进行了遗传多样性分析, 范咏梅等^[8] 采用 RAPD 技术分析了新疆 12 个菌株的遗传多样性。尚无关于我国葡萄灰霉病菌转座因子的研究和报道。本研究根据 Esterio 等^[9] 的报道设计引物, 对我国葡萄灰霉病菌菌株 Flipper 转座子进行研究, 探索模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、dNTPs、以及 *Taq* DNA 聚合酶浓度等因素对扩增效果的影响, 建立有效的检测灰霉病菌菌株 Flipper 转座子的 PCR 反应体系, 旨在为探索我国葡萄灰霉病菌转座子类型奠定基础, 进而为葡萄灰霉病的防治提供可靠的依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

从我国甘肃、天津、河南、山东、北京、辽宁等 14 个省、市、自治区的 30 个不同地区的葡萄上采集、分离、纯化得到 109 株葡萄灰霉病菌菌株, 由北京市农林科学院植物保护环境保护研究所保存。

1.2 转座子引物

Flipper 转座子扩增采用引物 F300(5'-GCACAA AACCTACAGAAGA-3') 和 F1500(5'-ATTCGTTTCTT GGACTGTA-3'), 由北京华大基因合成。

1.3 菌丝的培养和收集

将 4 ℃ 保存的灰霉菌菌株接种于 PDA 培养基上 21.5 ℃ 恒温黑暗培养箱中培养 7 d, 用灭菌牙签

收集菌丝于离心管中, -20 ℃ 保存备用。

1.4 灰霉菌总 DNA 的提取及检测

采用 CTAB 法提取灰霉菌基因组 DNA^[10], 并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。用紫外分光光度计分别测定 DNA 样品在 260, 280 nm 处的吸光值, 根据 $OD_{260/280}$ 估测其纯度。

表 1 Flipper 转座子 PCR 体系中各因素的浓度水平

Tab. 1 The level of concentration of various factors in the PCR reaction system of Flipper

因素 Factors	浓度优化 Majorization of concentration				
DNA 模板/ng Template DNA	20	30	40	50	60
引物/(mmol/L) Primer	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
dNTPs/(mmol/L)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
10 × <i>Taq</i> 10 Buffer(Mg^{2+})/μL	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
<i>Taq</i> DNA polymerase/U	0.125	0.250	0.375	0.500	0.625

1.5 Flipper 转座子 PCR 扩增体系的建立与优化

参照 Gadtón 等^[11] 的 PCR 反应体系: 10 × *Taq* 10 Buffer 3 μL, dNTP 0.25 mmol/L, Primer 0.20 mmol/L, *Taq* 酶 0.625 U, DNA 模板 40 ng, 总计 20 μL。对 PCR 反应体系中各因素的浓度条件进行优化(表 1), 按照模板 DNA、引物、dNTPs、10 × *Taq* 10 Buffer、*Taq* 酶的顺序依次进行单因素筛选, 每次都上一个因素筛选得到的最佳值作为固定值使用到下一个因素的筛选中, 每个处理设 3 次重复。

为了提高 PCR 反应体系扩增的特异性, 消除非特异性扩增, 对反应程序中退火温度和循环次数做梯度试验, 退火温度从 50 ℃ 到 60 ℃ 设 6 个梯度(50, 52, 54, 56, 58, 60 ℃); 循环次数设 3 个梯度(30, 35, 40 个循环)。

1.6 PCR 扩增产物检测及其回收克隆和测序

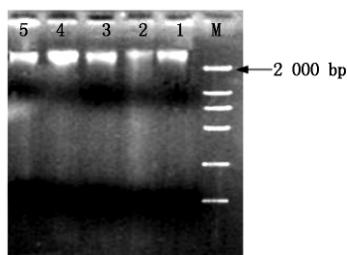
用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测。用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)回收、纯化 PCR 扩增产物, 并对回收片段进行克隆和测序。根据测序结果分析 Flipper 转座子引物扩增得到的目的片段。利用 DNAMAN 分析软件(DNAMAN 5.2.9 Demo version)进行序列处理、分析, 然后在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行 BLASTn 比对分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

选取 5 株灰葡萄孢菌株, 提取 DNA 后进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 均呈现较亮的单一条带, 表明提取的 DNA 样品浓度高、比较纯, 只有轻微的弥散荧光区出现, 可能是有少量降解, 但并不影响扩

增。紫外分光光度计测定 $OD_{260/280}$ 为 1.71 ~ 1.87, 定量分析表明, DNA 浓度在 1 248.6 ~ 1 895.5 ng/ μ L。说明采用 CTAB 法提取的灰霉菌 DNA 质量和浓度都达到了 PCR 反应的要求, 可以进行扩增反应。



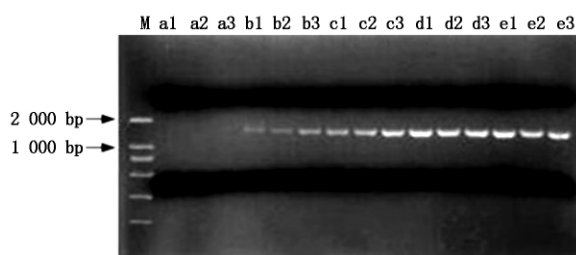
M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. SDXX3-4; 3. Gszy4-2; 4. GSLZnky14-1; 5. HeBCLzg2-1.

图1 灰霉菌 DNA 的检测

Fig.1 *Botrytis cinerea* DNA detection

2.2 Flipper 转座子扩增体系的优化

2.2.1 不同 DNA 模板浓度对扩增效率的影响 模板 DNA 的量会影响 PCR 扩增结果, 但最佳模板浓度范围取决于研究类群与模板纯度。在采用的 20 μ L 体系中, 设 5 个 DNA 浓度梯度(表 1), 其他条件不变, 进行相同条件的 PCR 扩增(图 2)。模板用量为 50 ng 时得到的条带清晰且无拖尾现象; 模板用量升高, 达到 60 ng 时, 扩增条带不清晰, 出现轻微拖尾现象; 模板用量为 20 ng 时, 无扩增产物; 模板量为 30 40 ng 时, 扩增条带较弱, 可能是因为模板量过少导致扩增效率低, 模板和引物不能有效配对。根据以上试验结果, 确定 DNA 模板用量为 50 ng。



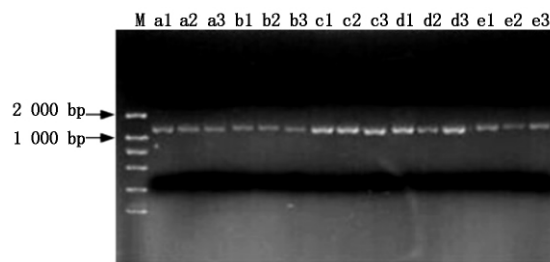
M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1. a. 20 ng; b. 30 ng; c. 40 ng; d. 50 ng; e. 60 ng.

图2 优化 DNA 模板浓度 PCR 扩增结果

Fig.2 The result of optimization of the concentration of DNA template

2.2.2 不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度对扩增效率的影响 *Taq* DNA 聚合酶在 PCR 中的用量受反应体积、酶活性、酶耐热性等因素的制约, 不同研究中用量差别较大, 这可能与应用不同厂家不同批次的 *Taq* DNA 聚合酶活性不同有关。本试验选择了 0.125, 0.250, 0.375, 0.500, 0.625 U 5 个梯度进行 PCR 扩增(图 3)。*Taq* DNA 聚合酶的用量为 0.125, 0.250 U 时, 扩增条带不够亮, 扩增产物较少; 用量为

0.625 U 时, 条带模糊并产生非特异性扩增, 据此浓度判断可能得到错误的结论; *Taq* DNA 聚合酶用量为 0.375, 0.500 U 时的扩增条带稳定清晰。因此, 将 *Taq* DNA 聚合酶用量确定为 0.375 U。

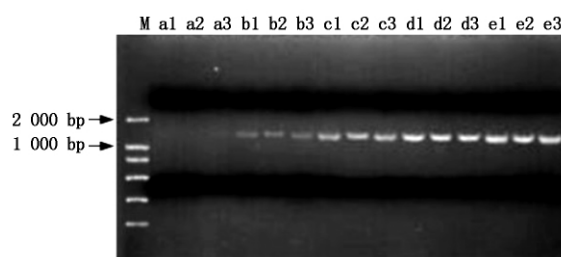


M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1. a. 0.125 U; b. 0.250 U; c. 0.375 U; d. 0.500 U; e. 0.625 U.

图3 优化 *Taq* DNA 聚合酶 PCR 扩增结果

Fig.3 The result of optimization of the *Taq* DNA polymerase

2.2.3 不同引物浓度对扩增效率的影响 引物浓度对 PCR 反应的影响较大, 引物的浓度过高时, 会引起错配和非特异性产物的出现, 引物浓度过低时, 可能得不到目的条带。选用 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mmol/L 5 个梯度进行优化试验(图 4)。引物用量为 0.10 mmol/L 时, 没有扩增产物; 引物用量为 0.25, 0.30 mmol/L 时, 特异性扩增条带明亮但模糊, 且在 2000 bp 以上出现一条较弱的非特异性条带; 引物用量为 0.20 mmol/L 时, 扩增条带清晰。因此, 选择 0.20 mmol/L 为引物的试验用量, 既有效防止非特异性产物的出现, 又能满足 PCR 扩增条带清晰的要求。



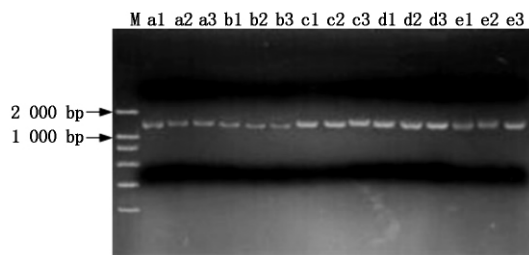
M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1. a. 0.10 mmol/L; b. 0.15 mmol/L; c. 0.20 mmol/L; d. 0.25 mmol/L; e. 0.30 mmol/L.

图4 优化引物浓度 PCR 扩增结果

Fig.4 Optimization of the primer concentration

2.2.4 不同 dNTPs 浓度对扩增效率的影响 dNTPs 为 PCR 反应中 DNA 的合成原料, dNTPs 的浓度过高可加快反应速度, 但同时会增加碱基的错误掺入率和试验成本, 而低浓度的 dNTPs 会导致反应速度的下降, 但可提高试验的精确性。选择 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mmol/L 5 个梯度进行分析(图 5)。加入 dNTPs 量为 0.05, 0.10 mmol/L 时, 扩增条带较弱, 扩增产物较少; dNTPs 用量为 0.15, 0.20 mmol/L 时, 条带清晰稳定, 说明在此浓度时

PCR 反应的特异性可以得到保证; dNTPs 用量为 0.25 mmol/L 时, 扩增条带比较模糊。所以, 选择 0.20 mmol/L 为 dNTPs 的实际用量。

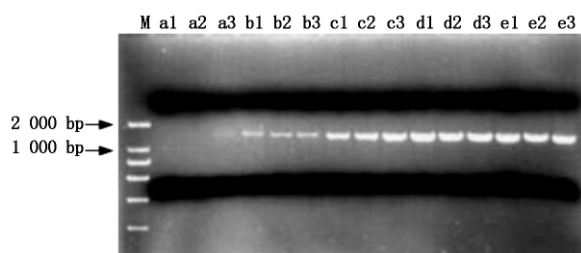


M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1.
a. 0.05 mmol/L; b. 0.10 mmol/L; c. 0.15 mmol/L;
d. 0.20 mmol/L; e. 0.25 mmol/L.

图5 优化 dNTPs 浓度 PCR 扩增结果

Fig.5 Optimization of the concentration of dNTPs

2.2.5 不同 Buffer(含 Mg^{2+}) 用量对扩增效率的影响 Mg^{2+} 作为 *Taq* 聚合酶的激活剂在反应体系中显得非常重要, Mg^{2+} 通过影响 *Taq* DNA 聚合酶活性影响 PCR 扩增, Mg^{2+} 不足, *Taq* 聚合酶作用效率低, 若其浓度太高, 非特异性扩增条带则增多。试验用 Buffer 中含有 Mg^{2+} , Buffer 用量选择 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 μ L 5 个梯度(图6)。Buffer 为 1.0, 1.5 μ L 时, 条带不清晰, 扩增产物较少; 在 2.0, 2.5, 3.0 μ L 用量时, 结果基本一致, 扩增条带清晰稳定, 扩增产物较多。因此, Buffer(含 Mg^{2+}) 的用量定为 2.0 μ L。

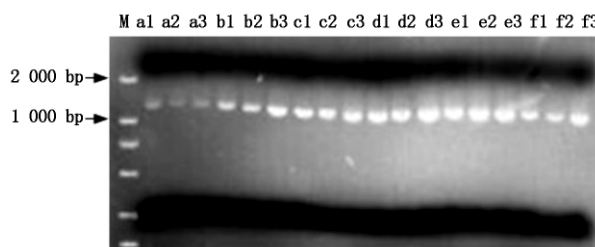


M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1.
a. 1.0 μ L; b. 1.5 μ L; c. 2.0 μ L; d. 2.5 μ L; e. 3.0 μ L.

图6 优化 Buffer 浓度 PCR 扩增结果

Fig.6 Optimization of the Buffer concentration

2.2.6 不同退火温度对扩增效率的影响 引物不同, 退火温度也不一样, 退火温度影响着模板和引物的特异性结合, 温度过高则模板与引物结合差, 产物少, 不利于检测; 温度过低则会出现非特异性扩增。设 50, 52, 54, 56, 58, 60 $^{\circ}$ C 6 个温度梯度, 50, 52 $^{\circ}$ C 时, 约 2 000 bp 以上出现一条非特异性条带; 54 $^{\circ}$ C 时, 扩增条带清晰稳定; 56, 58 $^{\circ}$ C 时, 扩增结果虽趋于稳定, 但拖尾现象较为严重, 且条带不清晰(图7); 60 $^{\circ}$ C 时, 因退火温度过高, 导致扩增产物较少。因此, 退火温度选择为 54 $^{\circ}$ C。

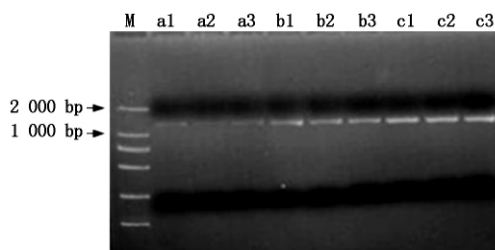


M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1.
a. 50 $^{\circ}$ C; b. 52 $^{\circ}$ C; c. 54 $^{\circ}$ C; d. 56 $^{\circ}$ C; e. 58 $^{\circ}$ C; f. 60 $^{\circ}$ C.

图7 退火温度的影响

Fig.7 The influence of the annealing temperature

2.2.7 不同循环次数对扩增效率的影响 循环次数直接影响扩增产物的量, 反应循环数如果过多, 虽然产物相应增多, 但其保真性会降低, 一般情况下进行 25~40 个循环。本试验设 3 个梯度, 分别为 30, 35, 40 个循环。30 个循环时, 扩增条带不清晰, PCR 产物量较少; 而 40 个循环与 35 个循环相比较, 40 个循环的条带较为清晰稳定(图8)。因此, PCR 反应程序选择 40 个循环。



M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1.
a. 30 循环; b. 35 循环; c. 40 循环。
M. BM2000 DNA Marker; 1. HuBzj2-1; 2. Gszy4-2; 3. GSLZnky14-1.
a. 30 cyclings; b. 35 cyclings; c. 40 cyclings.

图8 循环次数的影响

Fig.8 Influence of the number of cycles

2.2.8 优化的 PCR 反应体系和扩增程序 综合上述结果, 得到了优化的 PCR 反应体系: 10 \times *Taq* 10 Buffer 2 μ L, dNTP 0.20 mmol/L, Primer 0.20 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 0.375 U, DNA 模板 50 ng, 总计 20 μ L。扩增程序为: 90 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 5 个循环; 90 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。

2.2.9 Flipper 转座子扩增目的片段的测序、比对 利用 Flipper 引物扩增得到 1 159 bp 的片段, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)回收、纯化 PCR 扩增产物, 并对回收片段进行克隆和测序。将测序结果在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行 BLASTn 比对, 发现此 1 159 bp 的片段与 *Botryotinia fuckeliana* Flipper 转录因子转录酶基因相似性达 99%(图9), 说明扩增得到的片段是预期目的片段。

> lc153897

Length = 1 836

Score = 2 073 bits(1 122) ,Expect = 0.0

Identities = 1 152/1 165(99%) ,Gaps = 8/1 165(1%)

Strand = Plus/Minus

```

Query   3      TCCTTTTG-ATCTTCG-AAAAGCAGCCGGCGAGTTGGAATATCGGTCTCATCAACTTT  60
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1504    TCCTTTTGAATCTTTCGAAAAAGCAGCCGGCGAGTTGGAATATCGGTCTCATCAACTTT  1445

Query   61      CTCCATTATATCAGCATATTTTCGAATATCACTTCCTTTTGAGGGGTTTCCATGCAAT  120
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1444    CTCCATTATATCAGCATATTTTCGAATATCACTTCCTTTTGAGGGGTTTCCATGCAAT  1385

Query   121     AAAAGATGAATGTATATTCCATTGAAGCTCGGGATCATCATCTGAAACAGGATTTTGATA  180
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1384    AAAAGATGAATGTATATTCCATTGAAGCTCGGGATCATCATCTGAAACAGGATTTTGATA  1325

Query   181     TACAACCTCTTGATTACTGTTTTCGAGCAATAATCTGGACAAAAGAGGTTTAGCGCGGT  240
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1324    TACAACCTCTTGATTACTGTTTTCGAGCAATAATCTGGACAAAAGAGGTTTAGCGCGGT  1265

Query   241     TTGAGGCCATAAACCTGAAGCCTTCCACCCAGAAGTGATATTTCGAAGTGTTAAAGCTTT  300
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1264    TTGAGGCCATAAACCTGAAGCCTTCCACCCAGAAGTGATATTTCGAAGTGTTAAAGCTTT  1205

Query   301     TAATCTAGCTTCTGATAGCAGGCAAGAAAGTTCTTTTGCCAATGGGAGTAGAATCCGT  360
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1204    TAATCTAGCTTCTGATAGCAGGCAAGAAAGTTCTTTTGCCAATGGGAGTAGAATCCGC  1145

Query   361     CAATGAATCGAGAGTATTGAGGTGGTATCGATATTCTTTTTCAGAGGTGAAAATATTGA  420
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1144    CAATGAATCGAGAGTATTGAGGTGGTATCGATATTCTTTTTCAGAGGTGAAAATATTGA  1085

Query   421     TAAATCAAGAGGTTGTAGTACATGCGATGTATGGGGTGGTAAAAATAAGAGGTGTATATT  480
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1084    TAAATCAGGAGGTTGTAGTACATGCGATGTATGGGGTGGTAAAAATAAGAGGTGTATATT  1025

Query   481     ATTCTTGAAGCATTCAAGCATAAATTGAGTGGTTTCATGGCTTCCATGCCCATCCAAAAC  540
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  1024    ATTCTTGAAGCATTCAAGCATAAATTGAGTGGTTTCATGGCTTCCATGCCCATCCAAAAC  965

Query   541     AAGGAGTCTTGCTTCTTTTCGGTCGAGTTGGTGCTGATTGTGGTATAAACACCTCTTTAG  600
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  964      AAGGAGTCTTGCTTCTTTTCGGTCGAGTTGGTGCTGATTGTGGTATAAACACCTCTTTAG  905

Query   601     CCATTCCAAACCTGTAGAATCCGTAGTCCACCCATTATCTGTAGCAGTGAACCTCCACCC  660
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct  904      CCATTCCAAACCTGTAGAATCCGTAGTCCACCCATTATCTGTAGCAGTGAACCTCCACCC  845

```

```
Query 661 TTCATAGTTATCAAGTTTAAATGGGAAACCATTGTTGTTGAAGTGTTTTACCTTTGAATAT 720
          |||
Sbjct 844 TTCATAGTTATCAAGTTTAAATGGGAAACCATTGTTGTTGAAGTGTTTTACCTTTGAATAT 785

Query 721 AACCAAAGGTAAAAGTGCTCTTCCCGTAGCTGAGATACACTCAATAAAAGAGGTCCACGT 780
          |||
Sbjct 784 AACCAAAGGTAAAAGTGCTCTTCCCGTAGCTGAGATACACTCAATAAAAGAGGTCCACGT 725

Query 781 TCTTGAACCGGTTGCTTTTCTGAATAAAACGTCGCTTTGAACCTCCAAGTACCATACC 840
          |||
Sbjct 724 TCTTGAACCGGTTGCTTTTCTGAATAAAACGTCGCTTTGAACCTCCAAGTACCATACC 665

Query 841 ATTGAGACCTGGCCTTCCATTATACCAGCTTCATCCATATTCCATCTGTTTTCGGGCTT 900
          |||
Sbjct 664 ATTGAGACCTGGCCTTCTATTATACCAGCTTCATCCATATTCCATCTGTTTTCGGGCTT 605

Query 901 GATATGCTTAATTGCTGGTAAATCCAACCTTTTCAAAGAACTTGCTTATAATTTCGGTAGT 960
          |||
Sbjct 604 GATATGCTTAATTGCTGGTAAATCCAACCTTTTCAAAGAACTTGCTTATAATTTCGGTAGT 545

Query 961 TGCACCATTGATACGGGCATTATCGATTTTATATTGCCTTTTAGTCTTAATCTCTGGGTT 1020
          |||
Sbjct 544 TGCACCATTGATACGGGCATTATCGATTTTATATTGCCTTTTAGTCTTAATCTCTGGGTT 485

Query 1021 TCTTTCCAAAAAATATGTATCCATCGCTTGCCAGAGATAAATCACCTCCTTCGAGGTT 1080
          |||
Sbjct 484 TCTTTCCAAAAAATATGTATCCATCGCTTGCCAGAGATAAATCACCTCCTTCGAGGTT 425

Query 1081 GAGAATGGACTCTCCTAATTCTCGTATTGACGATGGG-----CTAGTTCCTAGGGCTTC 1135
          |||
Sbjct 424 GAGAATGGACTCTCCTAATTCTCGTATTGACGATGGGTAGGGCTAGTTCCTAGGGCTTC 365

Query 1136 CTGTACTAAAGTCCAATT-GCTAGA 1159
          |||
Sbjct 364 CTGTACTAAAATCCAATTTGCTAGA 340
```

图9 获得的基因片段与 *Botryotinia fuckeliana* Flipper 转录因子转录酶基因的比对结果

Fig. 9 BLASTn between gene fragment obtained and *Botryotinia fuckeliana* Flipper transposable element transposase gene

3 讨论

Flipper 和 Boty 转座子是存在于葡萄灰霉病菌中的 2 个转座因子,它们的存在与否与灰霉病菌菌株的分生孢子大小、生长率、致病性以及杀菌剂的抗性密切相关^[3]。通过对灰霉菌中 Flipper 和 Boty 2 个转座子的检测,Esterio 等^[9]、Gastón 等^[11]将智

利的灰霉病菌菌株分为 3 组:只含转座子 Boty 的菌株、transposa 菌株(同时含有 Flipper 和 Boty 转座子的菌株)和 vacuma 菌株(不含这 2 个转座子的菌株),并未检测到只含有 Flipper 转座子的菌株,而 transposa 菌株较普遍。Kálmán 等^[12]发现,匈牙利灰霉菌中上述 4 组类型均存在,但以 transposa 菌株最多。另外,vacuma 和 transposa 菌株在对乙烯菌核

利(农利灵)和乙霉威杀菌剂抗药性方面表现出差异^[3]; *vacuma* 菌株和只含有 Boty 转座子的菌株都对异菌脉敏感,而 *transposa* 菌株对异菌脉具有很强的抗性^[9]。

本研究从 DNA 模板、*Taq* 酶、引物、dNTPs、Buffer(Mg^{2+})、退火温度、循环次数等方面采用单因素筛选,最终确定我国葡萄灰霉病菌 Flipper 转座子 PCR 扩增体系为 20 μ L: 10 \times *Taq* 10 Buffer 2 μ L, dNTP 0.20 mmol/L, Primer 0.20 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 0.375 U, DNA 模板 50 ng。扩增程序为: 90 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 5 个循环; 90 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。这与 Gastón 等^[11]采取的扩增体系稍有不同,可能是由于具体试验条件不同或灰霉病菌株来源不同。利用优化的 Flipper 转座子扩增体系进行扩增,产生的目的条带较清晰,效果较好,测序后可知片段大小为 1 159 bp,比对后发现其与 *Botryotinia fuckeliana* Flipper 转录因子转录酶基因相似性达到 99%,证明了这一扩增体系的可靠性。建立了我国葡萄灰霉病菌的 Flipper 转座子 PCR 扩增体系,对我国灰霉病菌菌株进行转座子类型分类,进而深入探讨灰葡萄孢的转座子与其致病力、地理来源、抗药性等因素的关系奠定基础,为我国葡萄灰霉病的有效防治提供重要的依据。

参考文献:

- [1] 严红, 燕继晔, 王忠跃, 等. 葡萄灰霉病菌对 3 种杀菌剂的多重抗药性检测 [J]. 果树学报, 2012, 29(4): 625 - 629.
- [2] 陈林凤. 新疆灰霉菌遗传多样性及三种生防菌对灰霉
- 菌的拮抗作用初探 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009.
- [3] Giraud T, Fortini D, Levis C, et al. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species [J]. Mol Biol Evol, 1997, 14: 1177 - 1185.
- [4] 雷百战, 李国英, 石在强. 葡萄灰霉病原鉴定和生物学特性研究 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 22(增刊): 145 - 149.
- [5] 李喜玲. 灰葡萄孢致病力分化及与胞壁降解酶活性的关系研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [6] 张夏兰, 李兴红, 蔡建波, 等. 6 种农药和 2 种拮抗菌对葡萄灰霉病的防治试验 [J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2011(1): 27 - 30.
- [7] 余文贵, 董友磊, 赵丽萍, 等. 灰霉病菌 SSR 遗传多样性分析 [J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 18 - 20.
- [8] 范咏梅, 陈林凤, 郝敬喆, 等. 新疆灰霉病菌多态性及其致病力分化分析 [J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(3): 548 - 555.
- [9] Esterio M, Muñoz G, Ramos C, et al. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates present in Thompson Seedless Table Grapes in the Central Valley of Chile [J]. Plant Dis, 2011, 95: 683 - 690.
- [10] 董玉霞. 灰葡萄孢除草相关基因的克隆与功能分析 [D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [11] Gastón M, Patricio H, Yves B, et al. Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile [J]. The British Mycological Society, 2002, 106(5): 594 - 601.
- [12] Kálmán Z, Váczy Erzsébet S, Levente K, et al. Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian Vineyards [J]. Population Biology, 2008, 98: 1312 - 1319.